

Bonino, Julia ; Cagnassi, Leonela ; Giudicci, Aldana ; Ibarra, Jorge ; Oriolani March, Paulina ; Vidal, Andrea ; Molina, Mara ; Flores, Alejandro ; López, Débora ; Montellano Duran, Natalia ; Galante, Micaela ; Spelzini, Darío ; Boeris, Valeria

Caracterización fisicoquímica de aislados de proteínas vegetales

Energeia, Año 14, N° 14, 2016

Este documento está disponible en la Biblioteca Digital de la Universidad Católica Argentina, repositorio institucional desarrollado por la Biblioteca Central "San Benito Abad". Su objetivo es difundir y preservar la producción intelectual de la Institución.

La Biblioteca posee la autorización del autor para su divulgación en línea.

Cómo citar el documento:

Bonino, J. et al. Caracterización fisicoquímica de aislados de proteínas vegetales [en línea]. *Energeia*, 14(14), 2016. Disponible en: <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/revistas/caracterizacion-aislados-proteinas-vegetales.pdf> [Fecha de consulta:]

Caracterización fisicoquímica de aislados de proteínas vegetales

Julia Bonino¹, Leonela Cagnassi¹, Aldana Giudicci¹, Jorge Ibarra¹, Paulina Oriolani March¹, Andrea Vidal¹, Mara Molina¹, Alejandro Flores¹, Débora López^{1,2}, Natalia Montellano Duran², Micaela Galante², Darío Spelzini^{1,2}, Valeria Boeris^{1,2}

Proyecto: "Caracterización fisicoquímica de péptidos obtenidos por hidrólisis de proteínas vegetales"

¹ Universidad Católica Argentina. Facultad de Química e Ingeniería del Rosario.

² Universidad Nacional de Rosario – CONICET. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Área Físicoquímica

valeriaboeris@hotmail.com

Resumen. Las proteínas vegetales constituyen una fuente de nutrientes e ingredientes funcionales de interés y presentan amplia versatilidad en cuanto a sus características fisicoquímicas. La quinua y la chía han sido reconocidas debido a su alto contenido de proteínas y su apropiado balance de aminoácidos. Se prepararon aislados de proteínas de quinua y de chía por extracción alcalina seguida de precipitación en medio levemente ácido. Se optimizaron las condiciones de obtención de los aislados: la relación materia prima/solvente, el pH de extracción y el pH de precipitación. Se determinó el contenido de estructura secundaria de las proteínas y el potencial ζ de los aislados proteicos en suspensión. Se estudió el proceso de agregación ácida de las proteínas vegetales estudiadas mediante turbidimetría. Se determinó la capacidad del aislado de proteína de quinua de inhibir parcialmente el pardeamiento enzimático en banana.

Palabras clave: Aislado de proteína de chía y quinua, Propiedades estructurales de proteínas, Agregación proteica

Abstract. Vegetable proteins have wide versatility in their physico-chemical characteristics and constitute an interesting source of nutrients and functional ingredients. Quinoa and chia have been recognized because of their high protein content and their appropriate amino acid balance. Quinoa and chia protein isolates were prepared by alkaline extraction followed by precipitation in mild acid medium. Conditions of isolates obtainment were optimized: raw material / solvent ratio, pH of extraction and pH of precipitation. Secondary structure content of the proteins and ζ -potential of the protein isolates in suspension were determined. Acid aggregation process of these proteins was studied by turbidimetry. Ability of the quinoa protein isolate to partially inhibit enzymatic browning in banana was determined.

Keywords: Chia and quinoa protein isolate, Structural properties of proteins, Protein aggregation

Introducción

En Latinoamérica existe una gran variedad de cultivos: cereales, oleaginosas, legumbres, entre otros. Este tipo de cultivo constituye una fuente de proteína, generalmente no bien aprovechada, con potencial aplicación en la industria alimentaria. Es por esto que resulta de interés el desarrollo racional de procesos químicos que permitan recuperar las proteínas para poder utilizarlas en distintos productos, de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas, funcionales y biológicas.

Las proteínas vegetales (PV) constituyen una fuente de nutrientes e ingredientes funcionales de interés por su variedad, disponibilidad y costo [1-2], presentan amplia versatilidad en cuanto a sus características fisicoquímicas [3-4] y durante las últimas décadas, diferentes investigadores han realizado un amplio esfuerzo para mejorar la funcionalidad de las mismas a través de modificaciones químicas o enzimáticas [5-6]. Las posibilidades de su aprovechamiento en la industria alimentaria dependen tanto de su resistencia al procesamiento como de la presencia de compuestos antinutricionales. La quinua y la chía han sido reconocidas como alimentos completos debido a su calidad proteica, tanto por su alto contenido de proteínas como por su balance de aminoácidos.

Aislamiento de las proteínas vegetales

Las PV se obtienen a partir de las semillas trituradas o bien a partir de harinas desgrasadas mediante distintos métodos, que varían tanto en complejidad como en el producto que se obtiene. Los fraccionamientos en seco permiten obtener, por trituración y posterior tamizado de las semillas, fracciones enriquecidas en proteínas [7]. El tratamiento de harinas con solventes orgánicos y/o alcoholes permite eliminar lípidos e hidratos de carbono, dando lugar a concentrados proteicos [8]. Los aislados proteicos son las preparaciones de proteínas de mayor pureza y se obtienen por extracción alcalina seguida de precipitación isoeléctrica [9] o bien por micelización [10], solubilizando las proteínas en medios de alta fuerza iónica y diluyendo, lo que permite la precipitación de las proteínas. La metodología y las condiciones utilizadas para concentrar y/o aislar las proteínas afectan significativamente las propiedades fisicoquímicas de las mismas, por lo que resulta de interés caracterizar los productos que se obtienen.

En la Figura 1 se muestran imágenes de las etapas del proceso de obtención de los aislados de quinua (APQ). Se partió de harina desgrasada de quinua comercial que fue dispersada en medio alcalino, de manera de solubilizar las proteínas así como parte de los carbohidratos. Por centrifugación se eliminó la fracción insoluble y se acidificó la fracción soluble. De esta manera se eliminan los carbohidratos solubles, ya que las proteínas precipitan, y se descarta el sobrenadante. Los pasos posteriores de resuspensión y liofilización disminuyen las interacciones irreversibles entre las proteínas que pueden afectar negativamente su solubilidad.

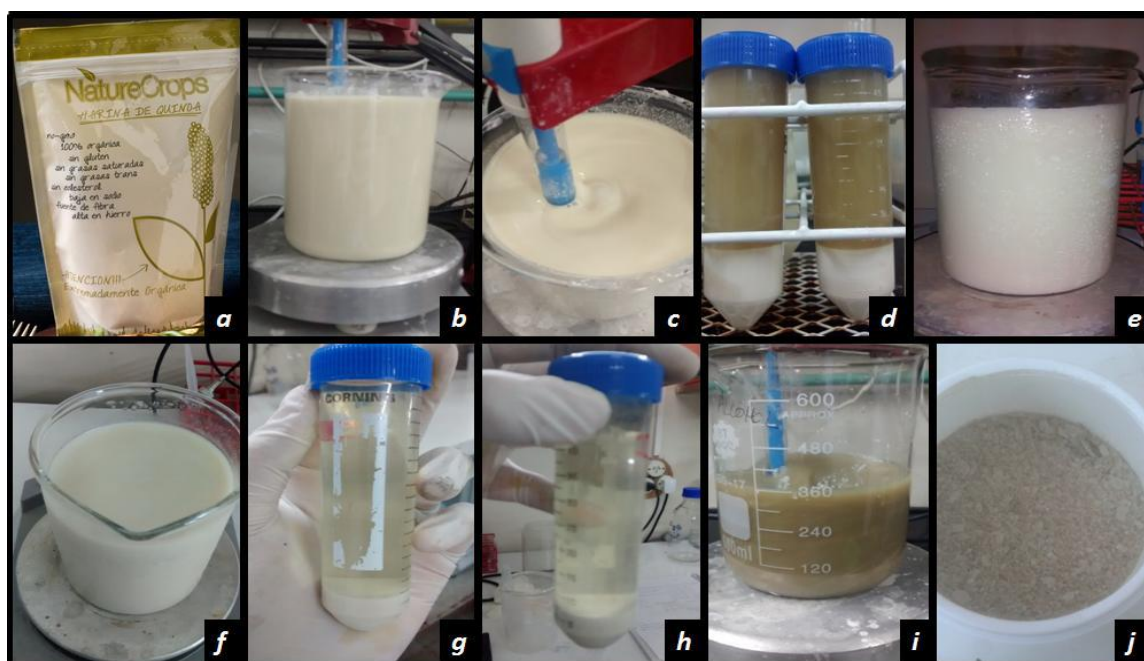


Figura 1: Proceso de obtención de los aislados de proteína de quinua. a) Materia prima: harina desgrasada de quinua; b y c) dispersión en medio alcalino; d) centrifugación y remoción de la fase sólida; e y f) acidificación; g y h) centrifugación, remoción del sobrenadante y lavado del precipitado; i) resuspensión del precipitado en medio alcalino; j) aislado liofilizado.

En la Figura 2 se esquematiza el proceso de obtención de los aislados de proteínas de chía (APC) a partir de semillas de chía trituradas, parcialmente desgrasadas. Las semillas de chía son ricas en aceites y se caracterizan por la presencia de un xiloglucano aniónico denominado mucílago de chía [11]. Por esta razón el proceso de extracción de las proteínas involucra algunas operaciones adicionales, respecto al proceso de obtención del APQ, tendientes a eliminar tanto el aceite como el mucílago.

Se calcularon los rendimientos para cada uno de los tratamientos ensayados y se determinó que las mejores condiciones para aislar las proteínas de quinua son dispersando 350 g de harina de quinua por litro de medio acuoso de extracción a pH 8 y precipitando a pH 4,5. De esta manera se obtiene un rendimiento del 10%. Por otro lado, las proteínas de chía requirieron etapas adicionales de extracción de mucílago y el mejor rendimiento (7%) se obtuvo cuando se usó una relación semilla triturada / medio líquido de 1:20, extrayendo a pH 12 y precipitando a pH 4,5. Los rendimientos obtenidos son muy buenos si se considera que prácticamente se recuperó la totalidad del contenido de proteínas del material de partida.

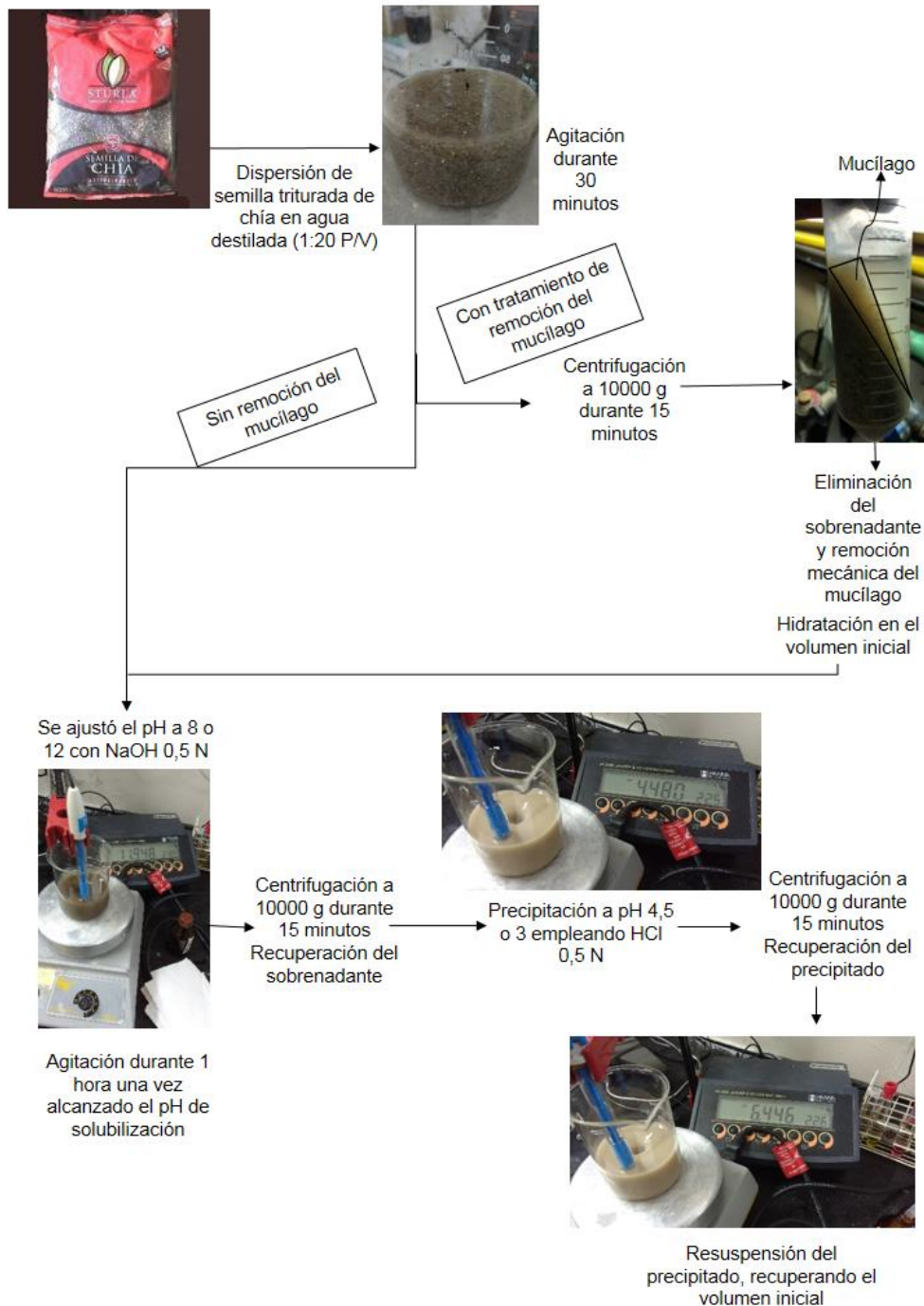


Figura 2: Proceso de obtención de los aislados de proteína de chíá.

Cuantificación de proteínas

Se cuantificaron las proteínas en las distintas muestras mediante el método de Bradford, que emplea Coomassie Brilliant Blue G-250 [12]. Se realizaron diluciones seriadas de las PV, se tomaron 100 μ L de cada una de ellas y se les adicionó 1 mL de reactivo de Bradford. La mezcla se incubó durante 30 min a temperatura ambiente, luego se determinó la absorbancia a 595 nm.

Se realizó una curva de calibración con caseinato de sodio y se calcularon las cifras de mérito correspondientes [13], que se muestran en la Tabla 1. Se hizo hincapié en esta actividad para enfatizar la importancia del correcto análisis de las curvas de calibración previo a la cuantificación de un analito de interés así como también para favorecer la aplicación de lo aprendido por los estudiantes en un ejemplo de aplicación concreto.

Tabla 1: Cifras de mérito correspondientes a la curva de calibración

Sensibilidad (UA.L/g)	4,26
Límite de detección (g/L)	0,0156
Límite de cuantificación (g/L)	0,0446
Coefficiente de correlación	0,975

Caracterización fisicoquímica de los aislados proteicos

La luz polarizada en el plano está compuesta por 2 componentes circularmente polarizadas de igual magnitud, una en sentido dextrógiro y otra en sentido levógiro. La espectroscopía de dicroísmo circular (DC) se basa en la absorción diferencial de estas dos componentes por parte de compuestos quirales. Los diferentes tipos de estructura secundaria de las proteínas dan lugar a espectros de DC característicos en el UV lejano, lo que permite estimar el contenido de estructura secundaria de una proteína a través de su espectro de DC [14].

Se evaluaron los espectros de dicroísmo circular de cada uno de los aislados de PV y se cuantificó el porcentaje de estructura secundaria utilizando el algoritmo K2D2 [15]. En la tabla 2 se muestra el porcentaje de estructura secundaria de cada uno de los aislados estudiados. Como puede observarse, se encontró que las PV se encuentran mayoritariamente en conformación de ovillo estadístico, lo que podría explicarse teniendo en cuenta que durante el proceso de extracción las mismas se vieron sometidas a pH alcalinos durante tiempos prolongados. La conformación de las PV afecta su estabilidad en solución, debido a que la exposición de residuos hidrofóbicos puede favorecer las interacciones proteína-proteína por sobre las interacciones proteína - solvente, lo que podría dar lugar a la formación de agregados proteicos cuyo tamaño depende de las condiciones del medio.

Las proteínas son macromoléculas que contienen grupos ionizables. Cuando las mismas se encuentran cargadas eléctricamente en medio acuoso, pequeños iones de carga opuesta se acumulan la superficie de la partícula proteica formándose una doble capa de iones: una capa fija, denominada capa de Stern, y otra difusa. Se define el potencial ζ como el potencial en la superficie donde se encuentran la capa de Stern y la capa difusa. La magnitud del potencial ζ puede definir el comportamiento de un sistema coloidal ya que regula las fuerzas electrostáticas entre cada una de las partículas cargadas [16].

Se determinó el potencial ζ de suspensiones acuosas de cada aislado utilizando un analizador de tamaño de partícula y los resultados se muestran en la Tabla 2. Los valores obtenidos indican que las partículas proteicas poseen una carga superficial negativa que les otorga cierta estabilidad en suspensión, evitando su floculación. La adición de iones así como la acidificación del medio podría provocar la desestabilización de las partículas en suspensión, dando lugar a agregados proteicos.

Tabla 2: Contenido de estructura secundaria y potencial ζ de los aislados de proteína

Muestra	potencial ζ (mV)	% hélice α	% lámina β	% ovillo estadístico
APQ	-39 \pm 5	2	8	90
APC	-56 \pm 6	-	-	100

Evaluación de la capacidad de agregación de las PV por acidificación

Las propiedades funcionales de las proteínas son aquellas propiedades no nutricionales que son capaces de impartir una característica tecnológica específica deseable a un producto alimenticio. Estas propiedades dependen fundamentalmente de factores intrínsecos propios de la proteína (conformación, relación y disposición de los aminoácidos, hidrofobicidad, carga eléctrica, forma, peso molecular, etc.), así como de factores extrínsecos del medio que la rodea, y que en ocasiones pueden modificarse (pH, fuerza iónica, temperatura, actividad acuosa, constante dieléctrica, etc.) [17]. Las propiedades funcionales de las proteínas pueden clasificarse en tres grupos principales de acuerdo a la interacción de las moléculas proteicas entre sí o con el solvente [18]. Las propiedades de solvatación dependen de las interacciones de las proteínas con el solvente, mientras que las propiedades texturales se relacionan con las interacciones proteína-proteína, y las propiedades superficiales dependen de la interacción de las proteínas con las interfases.

El estudio de las propiedades funcionales es importante para determinar los usos que pueden darse a las proteínas y aislados proteicos en la industria alimentaria. La disociación y agregación de proteínas debido a la acidificación del medio resulta, si las condiciones son apropiadas, en estructuras de gel. Cuando el pH alcanza el punto isoeléctrico de las proteínas, las mismas pierden su carga neta y disminuye la repulsión entre ellas. Esto permite que interaccionen, formando agregados, y se desestabilicen los coloides que se forman en solución [19]. La formación de los agregados

influye directamente en la estructura y las características de los geles.

La glucono-δ-lactona (GDL) es un aditivo alimentario que permite la acidificación lenta del medio. El pH final del sistema puede regularse según la cantidad de GDL adicionada. La velocidad de descenso de pH depende no sólo de la concentración de GDL sino también de la temperatura

Se estudió la agregación de los aislados de las PV, acidificando con GDL, por turbidimetría. Los cambios de tamaño de los agregados proteicos durante la acidificación se estudiaron basándose en la dependencia de la turbidez (τ) con la longitud de onda (λ) en un rango de 420-650 nm, en donde no hay absorción de los grupos cromóforos de las proteínas. Como las muestras no son monodispersas, la τ es función del peso molecular promedio en peso (M) de partículas de concentración c y del factor de disipación promedio (Q) de los agregados, que depende de la forma de los mismos. Este factor cuantifica las interferencias internas de la luz dispersada por las partículas a todos los ángulos, siendo significativo cuando las partículas poseen un tamaño mayor que la λ incidente:

$$\tau = HcMQ$$

Además, τ también depende de H, una función que involucra al índice de refracción de la solución (n_1) y del solvente puro (n_0) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$H = \frac{32\pi^2 n_0^2 \left(\frac{\partial n_1}{\partial c}\right)}{3N\lambda^4}$$

Trabajando matemáticamente, se puede llegar a la siguiente ecuación:

$$\beta = 4,2 + \frac{\partial(\log[Abs])}{\partial(\log[\lambda])}$$

donde Abs es la absorbancia y β es un parámetro relacionado con M y Q y, por lo tanto, con la forma y el tamaño de las partículas [20-21].

Se prepararon suspensiones acuosas de los aislados de PV y se les adicionó GDL para producir la acidificación lenta de los mismos. A intervalos de 1 minuto se determinó tanto el pH como el valor de β , a través de los espectros de absorbancia de las muestras. Se graficó $\log Abs$ vs. $\log \lambda$ para los distintos tiempos medidos y se calcularon las pendientes de cada una de las rectas obtenidas. Con los valores de las pendientes se calculó un valor de β para cada tiempo a través de la ecuación correspondiente. En la Figura 3 se muestra la variación de los valores de β con el tiempo y el pH.

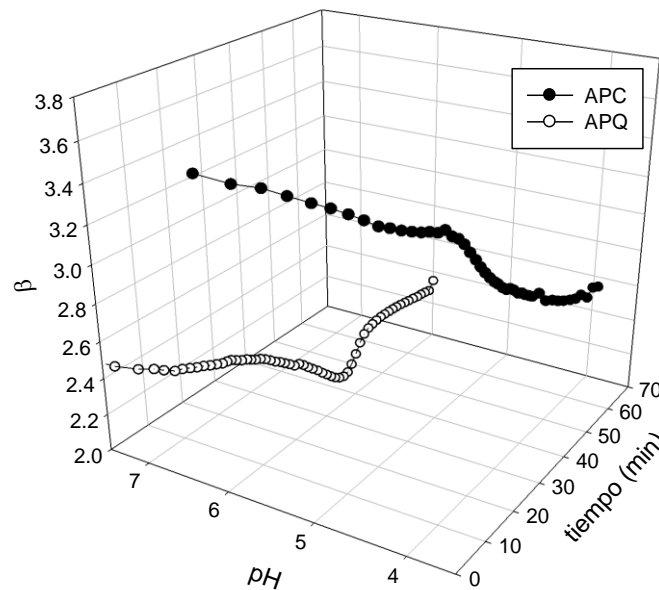


Figura 3: Evolución del parámetro β en el tiempo durante la acidificación lenta de suspensiones acuosas de APC y APQ.

Determinación de la capacidad antioxidante de las proteínas de quinua

Las PV son potenciales fuentes de péptidos bioactivos (PB), es decir, péptidos con actividad biológica. La capacidad antioxidante de los PB es una cualidad de interés ya que puede ser aplicable a la inhibición de distintos procesos oxidativos en alimentos. El pardeamiento enzimático de las frutas es un proceso no deseado ya que deteriora la aceptabilidad de dichos alimentos por parte de los consumidores. Sin embargo, previo a la obtención y ensayo de la capacidad antioxidante de los péptidos obtenidos por hidrólisis de las PV, resulta de interés ensayar la actividad antioxidante de las PV, debido a que es probable que las mismas presenten cierta actividad basal.

Se utilizó como modelo la oxidación de rodajas de banana expuestas al medio ambiente. La oxidación puede cuantificarse a través del color marrón que se desarrolla debido a la acción de la polifenol oxidasa. Analizando las imágenes de las distintas muestras, capturadas con una cámara de alta resolución bajo las condiciones de iluminación apropiadas, pueden obtenerse los parámetros de color L^* , a^* y b^* . L^* es la luminosidad y adquiere los valores de 0 (negro) a 100 (blanco), a^* representa el componente cromático verde cuando adquiere valores negativos y rojo cuando el mismo es positivo y b^* cuantifica la intensidad de azul o amarillo, dependiendo de su signo. Los componentes cromáticos adquieren valores que van desde -120 a +120 [22]. Debido a que las alteraciones en el color de las muestras de fruta debido a la oxidación se perciben como un aumento del color marrón, se calculó el índice de pardeamiento (IP) a partir de los parámetros L^* , a^* y b^* , de la siguiente manera:

$$IP = 581,4 \left[\left(\frac{a + 1,75L}{5,645L + a - 3,012b} \right) - 0,31 \right]$$

Se adicionó sobre cada una de las muestras una alícuota de una suspensión acuosa de APQ. Como control, se realizaron dos blancos: muestras sin tratar (control 1) y muestras adicionadas con agua (control 2). Las imágenes de las muestras antes (arriba) y después (abajo) de la exposición al aire durante 3 horas se muestran en la Figura 4. Puede notarse un incremento de la percepción de la intensidad del color marrón en las muestras luego de la incubación de 3 horas, lo cual se debe a la acción de la enzima polifenoloxidasa. Sin embargo, resulta apreciable a simple vista que el incremento en la coloración resultó de menor intensidad en las muestras tratadas con APQ que en las muestras control.

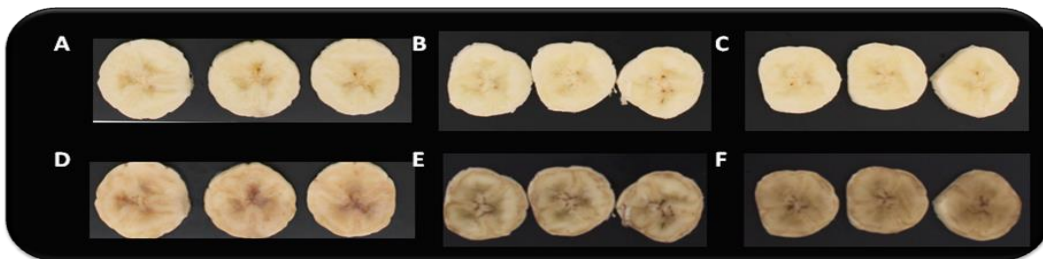


Figura 4: Imágenes de las rodajas de banana antes (A, B, C) y después (D, E, F) del período de exposición de 3 horas al aire. A y D: Muestras adicionadas con suspensiones acuosas de APQ. B y E: Muestras control 1, sin adición. C y F: Muestras control 2, adicionadas con agua.

En la Figura 5 se muestra la evolución del índice de pardeamiento de las muestras con el tiempo de incubación. Los datos muestran que los resultados son alentadores, ya que las muestras tratadas con APQ desarrollan menos coloración que las muestras control, en ambos tratamientos. Por otra parte, sería de esperar que cuando las proteínas de quinua sean hidrolizadas se vea incrementado este efecto inhibitorio del pardeamiento enzimático.

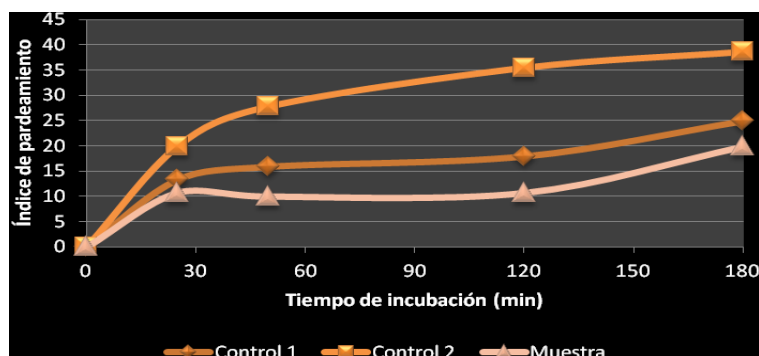


Figura 5: Evolución del índice de pardeamiento promedio de las muestras de rodajas de banana tratadas y sin tratar.

Conclusiones y Perspectivas

Se determinaron algunas de las propiedades fisicoquímicas, funcionales y biológicas de los aislados de proteínas vegetales estudiadas como paso previo a la hidrólisis de los mismos. Se plantea para el próximo período la profundización de este estudio y la obtención de los péptidos por hidrólisis de las PV.

Agradecimientos

Los investigadores agradecen a la Universidad Católica Argentina, a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2014-1571) y a la Universidad Nacional de Rosario (1BIO430) por el financiamiento. Se agradece a la Facultad de Química e Ingeniería del Rosario, a la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas y a CONICET por el lugar de trabajo. Se agradece la colaboración de los siguientes investigadores: Dra. Romina Ingrassia por participación en la preparación de los aislados de chíá, Dr. Pablo Busti por la liofilización de los aislados proteicos y Dra. Marina Soazo por las fotografías en la de las muestras de rodajas de banana.

Bibliografía

1. Kinsella, J.E. and N. Melachouris, Functional properties of proteins in foods: a survey. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 1976. 7(3): p. 219-280.
2. Venskutonis, P.R. and P. Kraujalis, Nutritional components of amaranth seeds and vegetables: a review on composition, properties, and uses. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2013. 12(4): p. 381-412.
3. Repo-Carrasco, R., C. Espinoza, and S.E. Jacobsen, Nutritional Value and Use of the Andean Crops Quinoa (*Chenopodium quinoa*) and Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*). *Food Reviews International*, 2003. 19(1-2): p. 179-189.
4. Alfredo, V.-O., et al., Physicochemical properties of a fibrous fraction from chia (*Salvia hispanica* L.). *LWT - Food Science and Technology*, 2009. 42(1): p. 168-173.
5. Guo, L., et al., Food protein-derived chelating peptides: Biofunctional ingredients for dietary mineral bioavailability enhancement. *Trends in Food Science & Technology*, 2014. 37(2): p. 92-105.
6. Segura-Campos, M.R., et al., Biological potential of chia (*Salvia hispanica* L.) protein hydrolysates and their incorporation into functional foods. *LWT - Food Science and Technology*, 2013. 50(2): p. 723-731.
7. Vázquez-Ovando, A., D. Betancur-Ancona, and L. Chel-Guerrero, Physicochemical and functional properties of a protein-rich fraction produced by dry fractionation of chia seeds (*Salvia hispanica* L.). *CyTA-Journal of Food*, 2013. 11(1): p. 75-80.
8. Millán, F., et al., Obtención y aplicaciones de concentrados y aislados protéicos. *Grasas y Aceites*, 2001. 52: p. 127-131.
9. Kaur, M. and N. Singh, Characterization of protein isolates from different Indian chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *Food Chemistry*, 2007. 102(1): p. 366-374.
10. Cordero-De-Los-Santos, M., et al., Physicochemical and functional characterisation of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolates obtained by isoelectric precipitation and micellisation. *Food science and technology international*, 2005. 11(4): p. 269-280.
11. Dick, M., et al., Edible film production from chia seed mucilage: effect of glycerol concentration on its physicochemical and mechanical properties. *Carbohydrate Polymers*, 2015.
12. Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 1976. 72(1-2): p. 248-254.
13. Olivieri, A.C., et al., Uncertainty estimation and figures of merit for multivariate calibration (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 2006. 78(3): p. 633-661.
14. Kelly, S.M., T.J. Jess, and N.C. Price, How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2005. 1751(2): p. 119-139.
15. Perez-Iratxeta, C. and M.A. Andrade-Navarro, K2D2: estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *BMC structural biology*, 2008. 8(1): p. 25.
16. Moreno, R., J. Moya, and J. Requena, Electroquímica de suspensiones cerámicas. *Bol. Soc. Esp. Ceram. Vidr*,

1987. 26(6): p. 355-365.

17. Petruccelli, S. and M.C. Anon, Relationship between the Method of Obtention and the Structural and Functional Properties of Soy Proteins Isolates. 1. Structural and Hydration Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994. 42(10): p. 2161-2169.
18. Kinsella, J.E., Functional properties of soy proteins. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1979. 56(3): p. 242-258.
19. de Kruijff, C.G., Skim Milk Acidification. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1997. 185(1): p. 19-25.
20. Risso, P., et al., Effect of size, proteic composition, and heat treatment on the colloidal stability of proteolyzed bovine casein micelles. *Colloid and Polymer Science*, 2007. 285(7): p. 809-817.
21. Horne, D.S., Determination of the fractal dimension using turbidimetric techniques. Application to aggregating protein systems. *Faraday Discussions of the Chemical Society*, 1987. 83: p. 259-270.
22. Yam, K.L. and S.E. Papadakis, A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces. *Journal of Food Engineering*, 2004. 61(1): p. 137-142.